

PN - JP7087988 A 19950404

PD - 1995-04-04

PR - JP19930234827 19930921

OPD - 1993-09-21

TI - CULTURE OF MARINE FINE ALGAE

IN - UEHARA KENICHI; IIZUKA TOKIO; TAKEUCHI DAIZO

PA - KAWASAKI STEEL CO

IC - C12P7/64 ; C07C57/03 ; C12P7/40

© WPI / DERWENT

TI - Culture of marine microalgae producing docosahexanoic acid used for e.g. cholesterol-lowering action - comprises incubating microalga on medium contg. poly:ol(s) e.g. mannitol

PR - JP19930234827 19930921

PN - JP7087988 A 19950404 DW199522 C12P7/64 005pp

PA - (KAWI) KAWASAKI STEEL CORP

C - C12P7/64 C12R1/89

IC - C07C57/03 ; C12P7/40 ; C12P7/64

AB - JP7087988 A process for culturing a marine microalga (specifically: *Cryptothecodinium cohnii* (ATCC 30021) producing docosahexanoic acid, wherein the incubation is made on a medium contg. a polyol or polyols (specifically: glycerol, mannitol, sorbitol, sucrose) but no trishydroxymethylaminomethane, is new.

- USE - Docosahexanoic acid is known to have cholesterol-lowering action, anti-coagulant action, anti-cancer action, and action improving cerebral metabolism, and useful in treatment of senile dementia or Alzheimer's disease. The invention provides an improved process for culturing the microalgae to produce docosahexanoic acid efficiently on an industrial scale. No expensive tris-buffer is required in the incubation.

- The polyol-contg. sugar alcohol (glycerol, erythritol, mannitol, sorbitol) and nonreducing sugar (sucrose, raffinose) may be added to the medium in a content of 10 - 100 mM. The algae may be incubated on a medium contg. carbon source (e.g. galactose, glucose, fish oil, soybean oil, lactate, acetate, EtOH), nitrogen source (e.g. yeast extract, meat extract, peptone, waste molasses, corn steep liquor, alpha-amino acid, KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl), inorganic salt (e.g. condensate of artificial sea water, NaCl, MgSO<sub>4</sub>) and trace metal (e.g. Fe, Mn, Co, Zn) at 15 - 34 deg.C and pH 5 - 9, pref. 6 - 8, with shaking or rotation. Example of the culture medium: 30 g

glucose, 2 g corn steep liquor, 2 g Na glutamate, 4.56 g glycerol, 20 g NaCl, 10 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1 g  $\text{KNO}_3$ , 10 mg  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 30 mg  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 30 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 1.5 mg  $\text{FeCl}_3$ , 4.5 mg  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.63 mg  $\text{ZnSO}_4$ , 0.015 mg  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , and 1 L distilled water. The cultured algae are collected and extracted with  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  to yield a crude lipid portion, which is saponified with NaOH and directly or after esterification applied to chromatography, distillation or supercritical extraction to yield pure docosahexaenoic acid. (Dwg.0/0)

OPD - 1993-09-21

AN - 1995-166385 [22]

© PAJ / JPO

PN - JP7087988 A 19950404

PD - 1995-04-04

AP - JP19930234827 19930921

IN - UEHARA KENICHI; others.02

PA - KAWASAKI STEEL CORP

TI - CULTURE OF MARINE FINE ALGAE

AB - PURPOSE: To efficiently culture a specific marine fine alga excellent in producibility for docosahexaenoic acid by using a medium containing a polyol free from trishydroxymethylaminomethane.  
- CONSTITUTION: When an alga, such as *Cryptocodinium cohnii* ATCC 30021, belonging to marine fine algae and capable of producing docosahexaenoic acid is cultured and multiplied to obtain the docosahexaenoic acid from the alga cells, the culture is performed in a medium not containing trishydroxymethylaminomethane but containing one or more kinds of polyols selected from glycerol, mannitol, sorbitol and saccharose (preferably in a concentration of 10-100mM).

I - C12P7/64 ; C07C57/03 ; C12P7/40

C - C12P7/64 C12R1/89

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-87988

(43) 公開日 平成7年(1995)4月4日

(51) int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 7/64		7432-4B		
C 0 7 C 57/03		9356-4H		
C 1 2 P 7/40		8114-4B		
// (C 1 2 P 7/64				
C 1 2 R 1:89)				

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平5-234827

(22) 出願日 平成5年(1993)9月21日

(71) 出願人 000001258

川崎製鉄株式会社

兵庫県神戸市中央区北本町通1丁目1番28号

(72) 発明者 上 原 健 一

千葉県千葉市中央区川崎町1番地 川崎製鉄株式会社技術研究本部内

(72) 発明者 飯 塚 時 男

千葉県千葉市中央区川崎町1番地 川崎製鉄株式会社技術研究本部内

(72) 発明者 武 内 大 造

千葉県千葉市中央区川崎町1番地 川崎製鉄株式会社技術研究本部内

(74) 代理人 弁理士 渡辺 望穂 (外1名)

(54) 【発明の名称】 海洋性微細藻類の培養方法

(57) 【要約】

【目的】 ポリオール類を存在させた培地で海洋性微細藻類を安定して培養し、ドコサヘキサエン酸を製造する方法の提供。

【構成】 海洋性微細藻類に属し、かつ、ドコサヘキサエン酸を産生する能力を有する藻類を培養して増殖させた藻体よりドコサヘキサエン酸を製造するに際し、培地中にトリスヒドロキシメチルアミノメタン無添加のポリオール類を有する培地を用いる海洋性微細藻類の培養方法。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】海洋性微細藻類に属し、かつ、ドコサヘキサエン酸を産生する能力を有する藻類を培養して増殖させた藻体よりドコサヘキサエン酸を製造するに際し、トリスヒドロキシメチルアミノメタン無添加のポリオール類を有する培地を用いることを特徴とする海洋性微細藻類の培養方法。

【請求項2】前記ポリオール類が、グリセロール、マンニトール、ソルビトールおよびサッカロースからなる群より選ばれる1種または2種以上である請求項1に記載の海洋性微細藻類の培養方法。

【請求項3】前記ポリオール類が、10~100mMの濃度である請求項1に記載の海洋性微細藻類の培養方法。

【請求項4】前記藻類が、クリプトコディニウム・コーニー (*Cryptocodinium cohnii*) ATCC30021である請求項1~3のいずれかに記載の海洋性微細藻類の培養方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ドコサヘキサエン酸を産生する能力のある海洋性微細藻類を良好に増殖させドコサヘキサエン酸の生産性を高める培養方法に関するものである。ドコサヘキサエン酸は、近年、コレステロール低下作用、抗血液凝固作用、学習機能向上作用など多彩な生理作用が報告されている高度不飽和脂肪酸である。

## 【0002】

【従来の技術】多彩な生理作用が報告されている高度不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸について、魚油以外に起源を求め微生物などに選択的に産生させる検討が行われてきた。中でも、海洋性微細藻類に属するクリプトコディニウム・コーニーを増殖させることによりドコサヘキサエン酸を産生させることが検討されている。

【0003】クリプトコディニウム・コーニーなど海洋性微細藻類の培地は採取する場所により生理的性質が異なったり、滅菌によって沈殿を形成する海水を基本として、この海水に欠乏しやすい栄養物質を添加した天然培地よりも、高圧滅菌によっても沈殿を形成せず実験の再現性も保証される合成培地が好ましい。

【0004】クリプトコディニウム・コーニーの培養について合成培地を用いたものを幾つか挙げて示すと、R・ジェームス・ヘンダーソンらによるAXM培地 (*Phytochemistry*, 27 (6), 1679-1683 (1988) 参照) や、R・C・タットユルらによるMLH培地 (*Phycologia*, 14 (1), 1-8 (1975) 参照) が報告されているが、ドコサヘキサエン酸の生産性への効果については触れられていない。

【0005】また、マーテック社による検討では、ドコ

2

サヘキサエン酸の収量の増大を目的として天然海水または人工海水を基本とし、グルコースと酵母エキスを加えた培地による培養が報告されている (WO91/11918) が、合成培地の個々の成分が藻体増殖やドコサヘキサエン酸蓄積に与える効果については触れられていない。

【0006】一方、本発明者らは、特願平04-344279号で特定の糖類、有機窒素源類、無機塩類および重金属元素を含有する成分を必須成分とする培地を用いて、藻類の安定した増殖とドコサヘキサエン酸の高い生産性を示した。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上記培地中にはトリス (トリスヒドロキシメチルアミノメタン) などの緩衝剤を添加することが例示されているが、高価であり、その成分は工業的規模での大量培養を行なう場合に大きな問題となる。

【0008】さらに、海洋性微細藻類に属し、かつ、ドコサヘキサエン酸を産生する能力を有する藻類を、高価な薬品であるトリスを添加しなくても添加時と同等に増殖させ、脂質中のドコサヘキサエン酸の含量をさらに高めるための簡便でかつ有効な培地組成の開発が望まれている。

## 【0009】

【課題を解決するための手段】本発明では、これらの問題点を解決するために鋭意検討した結果、ドコサヘキサエン酸を産生する能力を有する海洋性微細藻類を、ポリオール類としてグリセロール、マンニトール、ソルビトール、サッカロースなどを存在させた培地で培養することにより、トリスを添加しなくても添加時と同等に藻体が安定して増殖し、藻体の脂質中のドコサヘキサエン酸 (DHA) の含量が顕著に上昇することを見だし、本発明をなすに至った。

【0010】すなわち、本発明は海洋性微細藻類に属し、かつ、ドコサヘキサエン酸を産生する能力を有する藻類を安定に増殖させ、その藻体よりドコサヘキサエン酸を製造するに際し、ポリオール類としてグリセロール、マンニトール、ソルビトール、サッカロースなどを有する培地で培養する海洋性微細藻類の培養方法を提供する。そして、海洋性微細藻類が、クリプトコディニウム・コーニー (*Cryptocodinium cohnii*) ATCC30021であるのが好ましい。また、ポリオール類が、10~100mMの濃度であるのが好ましい。

【0011】以下に、本発明を詳細に説明する。

【0012】本発明において利用される微生物は、海洋性微細藻類に属し、かつ、ドコサヘキサエン酸を産生するものであればいずれでもよく、例えばクリプトコディニウム・コーニー (*Cryptocodinium cohnii*) などがある。これらの微生物として、A

TCC (American Type Culture Collection) などの各種保存機関から入手できる公知のものも利用することが可能である。具体例としては、クリプトコディニウム・コーニー ATCC 30021、30543、30556、30571、30672、30575、50051、50053、50055、50056、50058、50060等が挙げられる。このほか微生物に、例えば、紫外線照射や各種変異剤による処理等の公知の変異処理を施した変異株の使用も本発明に包含されるものである。本発明において海洋性微細藻類の液体振盪培養および液体深部培養による増殖およびドコサヘキサエン酸の産生に関しては、ポリオール類を必須成分として含有することが肝要である。

【0013】本発明において用いられるポリオール類(多価アルコール類)は、具体的には、グリセロール、エリスリトール、マンニトール、ソルビトールなどの糖アルコール類、サッカロース、ラフィノース、テンデロースなどの非還元性糖類が挙げられ、目的に応じて使い分けることが可能であり、さらにこれらを組み合わせることも可能である。濃度が変化せず、また、栄養分として資化された場合に化学変換により生じ、不純な原因となる二次代謝産物が産生されない点から、海洋性微細藻類が資化できない上述のポリオール類を用いることが好ましい。本発明において培地に添加するポリオール類(多価アルコール類)の濃度は、10~100mM、好ましくは15~50mMである。培地中のポリオール類の濃度が10mM未満では、トリス添加時に比較して、高い藻体収率が得られず、よってドコサヘキサエン酸を得ることが不可能である。また、100mMを超えると、増殖が著しく遅くなったり、藻体の産生する脂質量が大きく減少したりして、ドコサヘキサエン酸が減少し好ましくなく、また、培地粘度の上昇により酸素供給に悪い影響を与え好ましくない。

【0014】本発明において用いられる培地成分のうち炭素源としては、例えば、ガラクトース、グルコースなどの炭水化物、魚油、大豆油などの油脂類、乳酸、酢酸などの有機酸類、エタノールなどのアルコール類などが挙げられ、さらにこれらを組み合わせることも可能である。

【0015】窒素源としては例えば、酵母エキス、牛肉エキス、ペプトン、蔗糖蜜、コーンステイープリカー、 $\alpha$ -アミノ酸など有機態窒素や、硝酸カリウム、塩化アンモニウム等の無機態窒素が挙げられ、さらにこれらを組み合わせることも可能である。

【0016】無機塩類としては、市販の人工海水の濃縮物を用いることも可能であるが、例えば、塩化ナトリウム、硫酸マグネシウムなどを組み合わせて用いることも可能である。

【0017】重金属元素を含む成分としては、例えば、鉄、マンガン、コバルト、亜鉛などの単体、イオン、塩

化物、硫酸塩、硝酸塩など種々の塩が挙げられる。以上のほか、重金属元素を含む成分の安定化のために例えば、ホウ酸やエチレンジアミン四酢酸を用いることも可能である。

【0018】培地のpHは通常5~9、好ましくは6~8である。

【0019】培養方法としては、静置培養法を用いることも可能であるが、海洋性微細藻類の藻体生産性と脂質中のドコサヘキサエン酸の含量を考えると、振盪培養または深部通気攪拌培養法による培養が好ましい。振盪培養および深部通気攪拌培養の方法は、特開平04-077189号明細書に記載の通りの方法を用いればよい。培養温度としては通常15~34℃で藻体生産を行なうことが可能である。

【0020】培養終了後、培養液から藻体を回収する方法は、一般的な方法、例えば、10℃、8000rpm、10分間の遠心分離法や濾紙およびガラスフィルターによる濾過法等により行なうことが可能である。このように回収した藻体をそのままか、あるいは凍結乾燥法、熱風乾燥法などにより乾燥藻体としたのち、ドコサヘキサエン酸を高度に含有する粗脂質を抽出することが可能である。

【0021】藻体からドコサヘキサエン酸を高度に含有する粗脂質を抽出する方法としては、Folch法やBligh-Dyer法に代表されるクロロホルム/メタノール系等の有機溶媒による一般的な抽出方法を用いることが可能である。

【0022】粗脂質からドコサヘキサエン酸を精製する方法は、常法に従って行なうことが可能である。例えば、粗脂質をNaOHなどでケン化したのち、そのままか、あるいは酸またはアルカリ触媒によりアルコールエステルとすることで、カラムクロマトグラフィーまたは分別、蒸留、超臨界抽出などの方法によって容易に純品として得ることが可能である。これは藻体中にドコサヘキサエン酸と物性の非常に似通った高度不飽和脂肪酸が同時に含まれていないことによるもので、従来の魚油などからの精製に比較して非常に簡便で効率良くドコサヘキサエン酸を得ることが可能である。

【0023】以上のように本発明によれば、海洋性微細藻類を培養する際にポリオール類として、グリセロール、マンニトール、ソルビトール、サッカロースなどを存在させた培地で培養することにより、トリスを添加しなくても添加時と同等に藻体の安定した増殖がはかれるため、他の高度不飽和脂肪酸を含まず、脂質中のドコサヘキサエン酸の含量を顕著に上昇させたまま、海洋性微細藻類の生産性を向上できることが特筆すべき点であるが、本発明の趣旨に従い通常行なわれる改変は本発明に含まれる。

【0024】

【実施例】以下に本発明を実施例によりさらに詳しく説

5

明するが、これらの実施例が本発明の範囲を限定するものでないことは言うまでもない。下記の実施例中、海洋性微細藻類の藻体生産性は培養後の藻体の乾燥藻体重量で示し、また、ドコサヘキサエン酸の含有量は乾燥藻体からクロロホルム/メタノール(2:1)で抽出される粗脂質を三フッ化ホウ素メタノール錯体で脂肪酸メチルエステルとし、ヘプタデカン酸を内部標準として産生したドコサヘキサエン酸をガスクロマトグラフィーにより定量することにより測定した。

【0025】(実施例1~4)表1に示すポリオール類を含む培地それぞれ100mlを、300ml容三角フラスコに入れて滅菌をした。冷却後、この培地に、グルコース10g/l、酵母エキス2g/lを人工海水アクアマリン(八洲薬品株式会社製)に溶解しpH7.4に調整した培地で予め7日間180rpm、28℃で振盪

6

培養したクリプトコディニウム・コーニーATCC30021の培養液5mlを各々接種し、本培養として、28℃で、5日間回転振盪培養(180rpm)を行なった。培養藻体から得た乾燥菌体の重量とドコサヘキサエン酸の含量は、表1に示す結果を得た。また、ポリオール類の代わりにトリスを含む培地を用いた以外は、実施例1~4と同様に培養を行ない、参考例1として結果を表1に示した。

【0026】(比較例1)表1に示すポリオール類とトリスのいずれをも含まない組成の培地を用いた点以外は、実施例1~4と同様に培養を行ない、表1に示す結果を得た。

【0027】

【表1】

表 1

	実施例 1	実施例 2	実施例 3	実施例 4	比較例 1	参考例 1
グルコース	30 g/l	30 g/l	30 g/l	30 g/l	30 g/l	30 g/l
コーンスティブライカー	2 g/l	2 g/l	2 g/l	2 g/l	2 g/l	2 g/l
グルタミン酸ナトリウム	2 g/l	2 g/l	2 g/l	2 g/l	2 g/l	2 g/l
トリス						6 g/l
グリセロール	4.56 g/l	4.51 g/l	4.51 g/l			
マンニトール						
ソルビトール						
サッカロース				6.36 g/l		
NaCl	20 g/l	20 g/l	20 g/l	20 g/l	20 g/l	20 g/l
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10 g/l	10 g/l	10 g/l	10 g/l	10 g/l	10 g/l
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l
KNO <sub>3</sub>	1 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mg/l	10 mg/l	10 mg/l	10 mg/l	10 mg/l	10 mg/l
Na <sub>2</sub> EDTA	30 mg/l	30 mg/l	30 mg/l	30 mg/l	30 mg/l	30 mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	30 mg/l	30 mg/l	30 mg/l	30 mg/l	30 mg/l	30 mg/l
FeCl <sub>3</sub>	1.5 mg/l	1.5 mg/l	1.5 mg/l	1.5 mg/l	1.5 mg/l	1.5 mg/l
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	4.5 mg/l	4.5 mg/l	4.5 mg/l	4.5 mg/l	4.5 mg/l	4.5 mg/l
ZnSO <sub>4</sub>	0.63 mg/l	0.63 mg/l	0.63 mg/l	0.63 mg/l	0.63 mg/l	0.63 mg/l
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.015 mg/l	0.015 mg/l	0.015 mg/l	0.015 mg/l	0.015 mg/l	0.015 mg/l
蒸留水	1 L	1 L	1 L	1 L	1 L	1 L
pH	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
乾燥菌体収量 (g/l)	5.7728	6.0704	5.8938	6.2403	3.3256	5.2250
粗脂質収量 (g/l)	1.5900	1.5675	1.5829	1.6258	1.2074	2.0230
DHA収量 (g/l)	0.5478	0.5313	0.5583	0.5209	0.3446	0.5340

【0028】実施例1～4では、トリスを添加しなくても、参考例1と同等の菌体収量、脂質収量およびDHA収量が得られた。

【0029】

【発明の効果】本発明の培養方法によれば、ドコサヘキサエン酸を産生する能力を有する海洋性微細藻類を培養する際に、ポリオール類を存在させた培地で培養することにより、トリスを添加していなくても添加時と同等に菌体は安定して増殖し、他の高度不飽和脂肪酸を含まず、脂質中のドコサヘキサエン酸の含量を顕著に上昇さ

せることができる。また、本発明の培養方法によれば、トリスを用いないので、培養コストを低くすることができる。従来は、ドコサヘキサエン酸の製造は、魚油からの抽出により得ていたが、原料の供給が不安定で品質が一定せず、独特の臭気をもち、また、高度な分離精製技術によりドコサヘキサエン酸を得ていた。本発明の培養方法により、ドコサヘキサエン酸を高濃度に安定して生産でき、かつ、非常に簡便な分離精製技術により純度の高いものを供給できる点で工業的に有効な効果を奏するものである。